*УДК 576.895.132*

# К ВОПРОСУ О КОНСПЕЦИФИЧНОСТИ OSTERTAGIA OSTERTAGI И OSTERTAGIA LYRATA (NEMATODA: OSTERTAGIINAE)

**© Д. П. Кузнецов**

Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН,
ул. Мытная, 28, стр. 1, Москва, 119049
E-mail: dkuznetsov@mail.ru

Поступила 20.11.2008

Получены фрагменты внутреннего транскрибирующегося спейсера (ITS-2) рибосомальной ДНК *Ostertagia ostertagi* и *Ostertagia lyrata*, предположительно являющихся разными морфологическими формами одного вида. Установлены различия по ITS-2 *O. ostertagi* и *O. lyrata* на уровне 1.4 %. Различия ITS-2 у разных экземпляров *O. ostertagi* полностью отсутствовали. Также отсутствовали различия по ITS-2 между образцами *O. lyrata*. Относительно высокий процент различий ITS-2 *O. ostertagi* и *O. lyrata* при полном сходстве этого участка ДНК у разных экземпляров одной морфологической формы не позволяет уверенно отнести *O. ostertagi* и *O. lyrata* к одному виду.

*Ключевые слова*: систематика нематод, рибосомальная ДНК, ITS-2, *Ostertagia ostertagi*, *Ostertagia lyrata*.

Нематоды *Ostertagia ostertagi* (Stiles, 1892) и *O. lyrata* Sjoberg, 1926 — паразиты сычуга и тонкого кишечника домашних и диких жвачных. *O. ostertagi* — наиболее часто встречающийся у крупного рогатого скота представитель подсем. Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947 (Скрябин и др., 1954; Lichtenfels et al., 1997). Предполагается, что у некоторых видов остертагиин имеются самцы разных (чаще всего двух) четко различающихся морфологических форм (Dróżdż, 1974, 1995). Основанием для этой гипотезы послужило наблюдение, что некоторые формы самцов встречаются только в паре с самцами другой формы. Одна из морф в паре является доминирующей по количеству особей (мажорной), а вторая — сопутствующей (минорной). По традиционной классификации самцов мажорной и минорной морф из-за существенных различий в строении спикул и полового конуса относили к разным родам. Так, согласно Андреевой (1957) и Друджу (Dróżdż, 1965), *O. lyrata* числится в роде *Skrjabinagia* (Kassimov, 1942).

Первоначально в подсем. Ostertagiinae было выделено 14 полиморфных видов (Dróżdż, 1974). Позже этот список был расширен до 19 видов

(Dróżdż, 1995). Причем для некоторых пар принадлежность самцов к одному виду подтверждена опытами по перекрестному заражению (Daskalov, 1974; Dróżdż, 1974; Suarez, Cabaret, 1992), для других лишь предполагается.

В последние годы вопросы полиморфизма остертагиин изучали и методами молекулярной таксономии. Так, в результате сравнительных исследований участка ITS-2 (второго внутреннего транскрибирующегося спейсера) рибосомальной ДНК у *Teladorsagia circumcincta* (Stadelman, 1894), *T. trifurcata* (Ransom, 1907) и *T. davtiani* Andreeva et Satubaldin, 1954 не было выявлено четких различий, что подтверждает их принадлежность к одному виду (Stevenson et al., 1996). Похожие результаты были получены при изучении ITS-1 и ITS-2 *Ostertagia gruehneri* Skrjabin, 1929 и *O. arctica* Mizkewitsch, 1929 (Dallas et al., 2000), а также *Spiculopteragia asymmetrica* (Ware, 1925) и *S. quadrispiculata* (Jansen, 1958) (Santin-Duran et al., 2002). У *O. ostertagi* и *O. lyrata* были изучены участки ITS-1 рибосомальной ДНК и участки COX-1 митохондриальной ДНК, полученные данные говорят в пользу конспецифичности *O. ostertagi* и *O. lyrata* (Zarlenga et al., 1998).

Задачей нашего исследования была проверка гипотезы конспецифичности *O. ostertagi* и *O. lyrata* при помощи изучения участков ITS-2 рибосомальной ДНК.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Образцы самцов *O. ostertagi* и *O. lyrata* были получены от бизона из Приокско-террасного государственного природного биосферного заповедника (Серпуховской р-н Московской обл.). Нематод фиксировали в 70%-ном этаноле, их таксономическую принадлежность определяли по комплексу морфологических признаков, используя «Методику дифференциации нематод подсемейства Ostertagiinae», разработанную Кузнецовым (2006).

Отдельно из каждой особи были получены фрагменты ITS-2 рибосомальной ДНК. Было исследовано по 3 экз. самцов *O. ostertagi* и *O. lyrata*.

Для выделения ДНК образцы нематод помещали в 100 мкл лизирующего буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl, 0.1 мМ ЭДТА (pH 8.0) и 20 мкг/мл протеиназы К, инкубировали в твердотельном термостате в течение 18 ч при 55 °С, затем нагревали до 95 °С и выдерживали при такой температуре 10 мин. Выделенную ДНК хранили при –20 °С.

Фрагменты ITS-2 рибосомальной ДНК были получены с использованием праймеров NC 1 и NC 2, широко применяемых в молекулярной таксономии нематод (Gasser et al., 1993). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по следующей схеме: 1-й этап — денатурация ДНК при 90 °С в течение 2 мин, 2-й этап — денатурация ДНК при 90 °С 15 с, 3-й этап — отжиг праймеров при 55 °С 15 с, 4-й этап — элонгация цепи при 72 °С 30 с, 5-й этап — элонгация цепи при 72 °С 5 мин. Этапы со 2-го по 4-й повторялись циклически 30 раз.

Наличие продуктов ПЦР определяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле при напряжении 100 V. Для амлификации ДНК и выделения ДНК из геля использовали наборы реактивов производства «Силекс М» (Россия, Москва) согласно инструкциям производителя.

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant.

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета компьютерных программ DNAstar™.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из каждого исследованного образца нематод были получены фрагменты ITS-2 длиной 289 пар оснований (см. рисунок).

При сравнении нуклеотидных последовательностей ITS-2 по каждому из трех образцов *O. ostertagi* установлено их 100%-ное сходство. Аналогично полностью отсутствовали различия в сиквенсах между тремя изученными образцами *O. lyrata.*

При сравнении сиквенсов ITS-2 *O. ostertagi* и *O. lyrata* был выявлен лишь один вариабельный участок — с 23-го по 51-й нуклеотид (см. рисунок). В пределах этого участка различия отмечены по 4 позициям: 23—24 (гуанин и аденин у *O. ostertagi*, два цитозиновых основания у *O. lyrata*), 45 (делеция одного нуклеотида у *O. lyrata*) и 51 (делеция одного нуклеотида у *O. ostertagi*). Таким образом, при длине исследованных участков ITS-2 289 пар оснований различия по 4 позициям между *O. ostertagi* и *O. lyrata* составляют 1.4 %.

Литературные данные о сравнительном изучении ITS-2 нескольких представителей Ostertagiinae показывают, что имеются небольшие, но стабильные видовые отличия, позволяющие использовать информацию о строении этого участка в качестве довольно эффективного инструмента для решения спорных вопросов таксономии нематод этой группы. Так, Даллас и др. (Dallas et al., 2000) зарегистрировали различия в последовательностях ITS-2 у *Ostertagia leptospicularis* Assadov, 1953 и *O. gruehneri* на уровне 2.9 %, у *O. ostertagi* и *O. gruehneri* на уровне 8.7 %, у *O. ostertagi* и *O. leptospicularis* — 10.0 %. В том же исследовании при сравнении фрагментов ITS-2 *O. gruehneri* и *O. arctica*, предположительно являющихся морфами одного вида, нуклеотидная замена обнаружена лишь по одной позиции, что составило 0.4 %. Более того, эта замена была отмечена в ITS-2 лишь некоторых экземпляров и *O. gruehneri*, и *O. arctica*. Все это позволило авторам сделать вывод об идентичности ITS-2 *O. gruehneri* и *O. arctica* и подтвердить их принадлежность к одному виду. Следует заметить, что вероятность обнаружения различий прямо пропорциональна размеру изучаемого фрагмента ДНК. Длина фрагментов ITS-2, изученных Далласом и др. (Dallas et al., 2000), 246 пар оснований, что несколько меньше фрагментов, исследованных нами. При исследовании фрагментов ITS-2 рибосомальной ДНК *S. asymmetrica* и *S. quadrispiculata* также была обнаружена замена нуклеотида лишь в одной позиции и только в некоторых образцах как *S. asymmetrica*, так и *S. quadrispiculata*, длина изученного участка составляла 300 пар оснований (Santin-Duran et al., 2002).

```
                1                 20                  40                  60
                |--------|---------|---------|---------|---------|---------|
O. ostertagi  1 GCTGTTCATACACTGTCCCGTCGAATGGTATTTATTACTTTATTCGTGAT-AATTCCCAT
O. ostertagi  2 ............................................................
O. ostertagi  3 ............................................................
   O. lyrata  1 ......................CC....................-.....C.........
   O. lyrata  2 ......................CC....................-.....C.........
   O. lyrata  3 ......................CC....................-.....C.........

                61                80                 100                 120
                |--------|---------|---------|---------|---------|---------|
O. ostertagi  1 TCCAGTTCAAGAATATGAAATGCAACATGACGTTAACATTGTTAACGTTACTGAATGATA
O. ostertagi  2 ............................................................
O. ostertagi  3 ............................................................
   O. lyrata  1 ............................................................
   O. lyrata  2 ............................................................
   O. lyrata  3 ............................................................

                121              140                 160                 180
                |--------|---------|---------|---------|---------|---------|
O. ostertagi  1 CTGAATATATTACCACTATTTGAATGTACTCAATGAATATGAGATTGATTCAAATAGGGA
O. ostertagi  2 ............................................................
O. ostertagi  3 ............................................................
   O. lyrata  1 ............................................................
   O. lyrata  2 ............................................................
   O. lyrata  3 ............................................................

                181              200                 220                 240
                |--------|---------|---------|---------|---------|---------|
O. ostertagi  1 CATGTATGGTATTGTATATTCAATGTATCATTTATATATTGCAACCTGAACTCAGGCGTG
O. ostertagi  2 ............................................................
O. ostertagi  3 ............................................................
   O. lyrata  1 ............................................................
   O. lyrata  2 ............................................................
   O. lyrata  3 ............................................................

                241              260                 280                 300
                |--------|---------|---------|---------|---------|---------|
O. ostertagi  1 ATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTTAGCGGAGGAAAAGAAACTAAA
O. ostertagi  2 ..................................................
O. ostertagi  3 ..................................................
   O. lyrata  1 ..................................................
   O. lyrata  2 ..................................................
   O. lyrata  3 ..................................................
```

Нуклеотидные последовательности фрагментов ITS-2, полученные из трех образцов *O. ostertagi* и трех образцов *O. lyrata*.

Направление от 5′ к 3′-концу, (.) — то же нуклеотидное основание, что и у *O. ostertagi* 1, (–) — отсутствие нуклеотида.

Alignment of the ITS-2 sequences of three samples of *O. ostertagi* and three samples of *O. lyrata*.

В нашем исследовании уровень различий между нуклеотидными последовательностями ITS-2 предполагаемых морф одного вида оказался относительно высоким. Вместе с тем абсолютно отсутствуют различия ITS-2 у разных экземпляров одной морфы. Все это не позволяет считать полученные нами результаты однозначным подтверждением принадлежности *O. ostertagi* и *O. lyrata* к одному виду.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнительного исследования участков ITS-2 рибосомальной ДНК *O. ostertagi* и *O. lyrata*, предположительно являющихся разными морфологическими формами одного вида, установлено их различие на уровне 1.4 %. В то же время сиквенсы ITS-2, полученные из разных образцов *O. ostertagi*, оказались полностью идентичными друг другу. Также не зарегистрировано различий по ITS-2 между образцами *O. lyrata.*

Сравнительно высокий процент различий ITS-2 *O. ostertagi* и *O. lyrata* при полном сходстве этого участка ДНК у разных экземпляров одной морфологической формы не позволяет уверенно отнести *O. ostertagi* и *O. lyrata* к одному виду.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит сотрудника Всероссийского института гельминтологии им. К. И. Скрябина А. С. Москвина и сотрудницу Приокско-террасного государственного природного биосферного заповедника Н. В. Требоганову за помощь в сборе материала для исследований.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 08-04-00191, 08-04-00209, 07-04-90005. Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН, организованном при поддержке РФФИ (грант 00-04-55000).

### Список литературы

Андреева Н. К. 1957. Ревизия остертагией (трихостронглид) жвачных. Тр. Ин-та ветеринарии Казахского филиала ВАСХНИЛ. 8. Алма-Ата: Казахское гос. изд-во. 473—487.

Кузнецов Д. Н. 2006. Методика дифференциации нематод подсемейства Ostertagiinae. Тр. Всерос. ин-та гельминтологии. 43: 271—278.

Скрябин К. И., Шихобалова Н. П., Шульц Р. С. 1954. Трихостронгилиды животных и человека. Основы нематодологии. 3. М.: Изд-во АН СССР. 683 с.

Dallas J. F., Irvine R. J., Halvorsen O. 2000. DNA evidence that Ostertagia gruehneri and Ostertagia arctica (Nematoda: Ostertagiinae) in reindeer from Norway and Svalbard are conspecific. Int. Journ. Parasitol. 30: 655—658.

Daskalov P. 1974. On the reproductive relationships between Ostertagia circumcincta, Teladorsagia davtiani and O. trifurcata (Nematoda, Trichostrongylidae). Izvestiya na Tsentralnata Khelminthologichna Laboratoriya. 17: 59—72. Helminthol. Abstr. 44: 494.

Dróżdż J. 1965. Studies on the helminths and helminthiases in Cervidae I. Revision of the subfamily Ostertagiinae Sarwar, 1956 and an attempt to explain the phylogenesis of its representatives. Acta Parasitol. Polon. 13 (44): 445—481.

Dróżdż J. 1974. The question of genetic isolation and of permanent coincidence of some species of the subfamily Ostertagiinae. Third Int. Congr. Parasitol. 1: 477—478.

Dróżdż J. 1995. Polymorphism in the Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947 and comments on the systematics of these nematodes. Syst. Parasitol. 32 (2): 91—99.

Gasser R. B., Chilon N. B., Hoste H., Beverige I. 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. Nucl. Asids Res. 21: 2525—2526.

Lichtenfels J. R., Hoberg E. P., Zarlenga D. S. 1997. Systematics of gastrointestinal nematodes of domestic ruminants: advances between 1992 and 1995 and proposals for future research. Vet. Parasitol. 72 (3—4): 225—238.

Santin-Duran M., de la Fuente C., Alunda J. M., Rosental B. M., Hoberg E. P. 2002. Identical ITS-1 and ITS-2 sequences suggest Spiculopteragia asymmetrica and Spiculopteragia quadrispiculata (Nematoda: Trichostrongylidae) constitute morphologically distinct variants of a single species. Journ. Parasitol. 88 (2): 417—418.

Stevenson L. A., Gasser R. B., Chilon N. B. 1996. The ITS-2 rDNA of Teladorsagia circumcincta, T. trifurcata and T. davtiani (Nematoda: Trichostrongylidae) indicates that these taxa are one species. Int. Journ. Parasitol. 26 (10): 1123—1126.

Suarez V. N., Cabaret J. 1992. Interbreeding in the subfamily Ostertagiinae (Nematoda: Trichostrongylidae) of ruminants. Journ. Parasitol. 78 (3): 402—405.

Zarlenga D. S., Hoberg E. P., Stringfellow F., Lichtenfels J. R. 1998. Comparisons of two polymorphic species of Ostertagia and phylogenetic relationships within the Ostertagiinae (Nematoda: Trichostrongyloidea) inferred from ribosomal DNA repeat and mitochondrial DNA sequences. Journ. Parasitol. 84 (4): 806—812.

# ON THE CONSPECIFICITY OF OSTERTAGIA OSTERTAGI AND OSTERTAGIA LYRATA (NEMATODA: OSTERTAGIINAE)

D. N. Kuznetsov

*Key words*: nematode, systematics, ribosomal DNA, ITS-2, *Ostertagia ostertagi*, *Ostertagia lyrata*.

## SUMMARY

Partial sequences of the second internal transcribed spacer (ITS-2) rDNA were obtained for *Ostertagia ostertagi* and *O. lyrata*, which are supposedly constitute two morphologically distinct variants of the species. The 1.4 % level of difference between the ITS-2 sequences of *O. ostertagi* and *O. lyrata* was reported, whereas the sequences derived from worms of the same morph were completely identical. The data obtained prevent an attribution of *O. ostertagi* and *O. lyrata* to the same species.